

VERGLEICHENDE AUTORADIOGRAPHIEN EINES
BESTRAHLTEN TIERTUMORS NACH
³H-THYMIDIN-MARKIERUNG IN VITRO/IN VIVO

JOACHIM KLEINSCHMIDT

1972

Aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. O. Hug

Vergleichende Autoradiographien eines bestrahlten
Tiertumors nach ^3H -Thymidin-Markierung in vitro /
in vivo

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Joachim Kleinschmidt

aus

Bad Tölz

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Hug

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.1972



Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Es ist mir ein Bedürfnis, meinem hochverehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Otto Hug, für die großzügige Überlassung des Themas sowie für seine hilfreiche Unterstützung und zahlreiche Anregungen im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen zu danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Klaus-Rüdiger Trott für seinen Rat und seine Betreuung.

Inhaltsübersicht

	Seite
<u>Einleitung:</u> Strahlenbiologische Grundlagen der Tumorthherapie; Zielsetzung dieser Studie	2
<u>Hauptteil:</u> Versuchsanordnung (Apparaturen, Ver- suchstiere, Tumorbeschreibung)	4
Auswertungsmodus	7
Ergebnisse, Kurven	9
<u>Diskussion</u> der Resultate (im Vergleich mit der Literatur)	20
<u>Zusammenfassung</u>	23
<u>Literaturhinweise</u>	24

Einleitung

Die strahlenbiologische Forschung des letzten Jahrzehnts hat grundsätzlich neue Erkenntnisse über die zellulären Wirkungen ionisierender Strahlen erbracht und in quantitativer Weise die Abhängigkeit der zytoletalen Strahlenwirkungen von der Strahlendosis, der zeitlichen Dosisverteilung, der Strahlenqualität und vom Funktionszustand der Zellen ermittelt (LAMERTON 1967; MENDELSON 1967; TUBIANA 1968a, 1971; BERRY 1971). Im gleichen Zeitraum ist, insbesondere durch die Anwendung radioaktiver Indikatoren, unser Verständnis der Wachstums- und Proliferationskinetik normaler und maligner Gewebe gestiegen (MENDELSON 1965; PILGRIM, MAURER 1965; RAJESKY 1965, 1966, BASERGA 1967; DENEKAMP 1970; FEINENDEGEN 1971). Somit zeichnet sich die Möglichkeit ab, die Strahlentherapie biologisch zu unterbauen und durch gezielte zeitliche Dosierung zu verbessern.

In Tierexperimenten gelang es, mittels Zufuhr von ^3H -markiertem Thymidin und anschließender Autoradiographie von Gewebeproben das räumliche Proliferationsmuster von Geschwülsten vor und nach Bestrahlung a) mit verschiedenen hohen Dosen und b) nach einmaliger und fraktionierter Bestrahlung sichtbar zu machen und die proliferative Aktivität zu messen. Auf diese Weise ließ sich der zeitliche Verlauf der Strahlenschädigung und die kurative Wirkung verschiedener Dosierungen verfolgen. Versuche, auf diese Weise optimale Fraktionierungspläne zu entwickeln, sind erfolgversprechend (von SZCZEPANSKI, HUG, SPANGENBERG 1971).

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, in analoger Weise das räumliche und zeitliche Proliferationsmuster und die Strahlenempfindlichkeit menschlicher Geschwülste zu erfassen. Da aber eine radioaktive Markierung in vivo wegen der möglicherweise damit verbundenen Strahlenschädigung des gesamten Organismus' nur in ausgewählten Fällen in Frage kommt, muß

versucht werden, entsprechende Untersuchungen mittels einer in-vitro Markierung von Gewebeproben durchzuführen. Bisherige, vergleichende Studien mit parallel durchgeführter in-vivo und in-vitro Markierung von Tiertumoren erbrachten annähernd übereinstimmende Resultate:

der Markierungsindex ist in beiden Fällen ein brauchbares Maß für die Proliferationsaktivität des betreffenden Gewebes.

Mir war im Rahmen dieses Projektes die Aufgabe gestellt, den zeitlichen Verlauf strahleninduzierter Proliferationsstörungen mit gleichzeitiger, vergleichender in-vivo / in-vitro Markierung mit Tritium-Thymidin zu überprüfen und damit die Brauchbarkeit der in-vitro Markierung für die Erfassung der Strahlenwirkung auf menschliche Tumoren zu belegen.

Versuchsanordnung

Als Modelltumor wurde das transplantable Mamma-Carcinom 284/III des C3H-Mäusestammes gewählt, das seit über 5 Jahren im Institut für Strahlenbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF Neuherberg) gezüchtet, histologisch beobachtet und für Bestrahlungsstudien verwendet wird.

Durch Abtötung in Chloroform wurde dem Spendertier 3 Wochen nach Implantation des Tumors der Tumorknoten von 0,6 - 0,8 cm Durchmesser durch Hautschnitt entnommen und in einer Petrischale mit physiologischer Kochsalzlösung soweit zerkleinert, daß eine genügend große Anzahl gleichgroßer, kanülengängiger Tumorbröckel gewonnen wurde.

Als Empfängertier dienten weibliche, 3 Monate alte C3H-Mäuse, denen zur Vorbereitung der Implantation das Rückenfell geschoren wurde. Im kurzen Ätherrausch wurde ihnen nach Desinfektion mit 70 %igem Alkohol subcutan das Tumorgewebe injiziert. Nach etwa 10 Tagen waren beide Tumoren, die ursprünglich gesetzt waren, bei 80 - 90 % der Mäuse palpabel; die übrigen 10 - 20 % trugen nur einen Tumor. Bei 0,4 - 0,5 cm Knotendurchmesser wurden die Tumoren bestrahlt.

Bestrahlt wurde mit einer Roentgenanlage der Firma Müller, Hamburg, bei 300 kV Erzeugungsspannung und 10 mA Röhrenstrom und mit 0,6 mm Kupfer- und 1,0 mm Aluminiumfiltern. Die Mäuse wurden in einer tortenähnlichen Fassung fixiert, nachdem sie zuvor mit 4 mg EVIPAN-NATRIUM / Maus halbstündig narkotisiert worden waren. Während der Bestrahlung wurde das obere und untere Körperdrittel mit 0,5 cm dicken Bleiplättchen abgedeckt; nur die Rückenabschnitte mit dem Tumorknoten wurden exponiert. So geschützt überlebten auch die mit 1200 R bestrahlten Tiere 4 und mehr Tage. Der Fokus-Haut-Abstand betrug 51,5 cm; bei einer Dosisleistung von 60 R/min wurden 600 und 1200 R verabfolgt.

Die in-vivo Markierung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 2 uCi/g Körpergewicht der Maus. 1 Stunde nach Injektion wurden die Tiere in Chloroform abgetötet, die Tumorknoten exzidiert und in Formalinlösung fixiert (Formol 4 % + Trichloressigsäure 0,6 % + 3 mg unmarkiertes Thymidin pro 100 ml).

Für die in-vitro Markierung wurden die Tumoren den abgetöteten Mäusen in toto entnommen, in körperwarmem Nährmedium zerkleinert und unter Sauerstoffüberdruck in ^3H -Thymidin-angereicherter McCoy-Nährlösung inkubiert.

McCoy T.A., M. Maxwell, P.F. Kruse:

Amino Acid Requirements of the Novikoff Hepatoma in vitro
115 - 118;

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 100 1959.

Abbildung 1 skizziert die Versuchsanordnung:

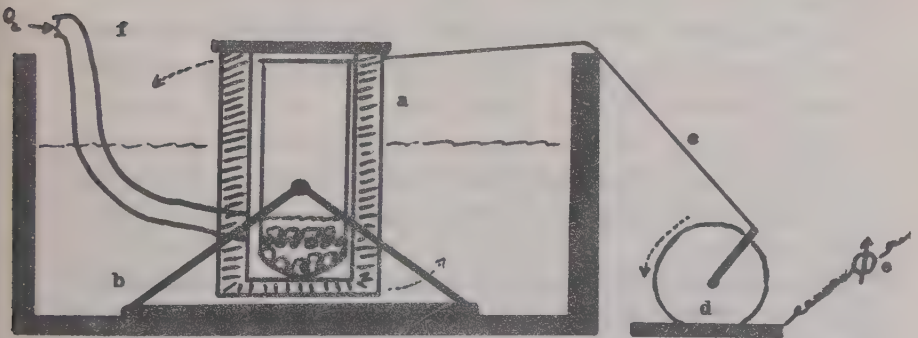


Abb. 1

Der hohe Metallzylinder a ist an der Aufhängung b befestigt. Über den Drahtzug c ist der Zylinder mit der Exzentrerschraube des Elektromotors d verbunden, welcher durch das Amperemeter e stufenlos zu regulieren ist und eine beliebige Kippfrequenz des Zylinders um etwa 40° ermöglicht. Die Teile a, b und c befinden sich in einem aufheizbaren Wasserbad; während der Inkubationsdauer wird die Wassertemperatur so gewählt, daß die Luftsäule in dem Zylinder 37° C beträgt (und somit auch das Reagenzglas mit seinen 2 ml aktivierten Nährmedium pro Inkubation. Dieses normal große Reagenzglas steht aufrecht im Zylinder). Das aktive Medium bedeckt die Tumorbröckel vollständig. Über den Schlauch f wird Sauerstoff unter 2,28 atü in den Zylinder eingeleitet; er wirkt über das offene Ende des Reagenzglases auf das Nährmedium ein. Die Druckerhöhung zu Beginn der Inkubation und der Druckabfall am Ende dauern nur wenige Sekunden. Während der 1-stündigen Inkubation enthält 1 ml McCoy-Lösung $15,4 \mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$ (einer Stammlösung mit einer spezifischen Aktivität von 2 mCi/mol).

Nach beendeter Inkubation wurde das aktive Medium abpipetiert, die Tumorbröckel in die Formalinlösung eingebracht und 12 Stunden bei 4° C fixiert.

Im Anschluß an die Fixierung in Formalin wurden die in-vitro und die in-vivo markierten Tumorpartikel im Autotechnicon durch die steigende Alkoholreihe gezogen und in Paraffin eingebettet.

Am Rottermikrotom wurden 5μ dicke Schnitte von diesen Paraffinklötzchen gewonnen. In der absteigenden Alkoholreihe wurden sie entparaffiniert und in der Dunkelkammer mit der autoradiographischen Fotoemulsion KODAK NTB 2 beschichtet. 12 Tage wurde unter Lichtabschluß bei 4° C exponiert. Entwickelt wurde mit KODAK D 19 Developer, fixiert mit KODAK Unifix No. 1/2 - 1. Nach halbstündiger Wässerung färbten wir die Präparate 7 Minuten in Hämalaun und 2 Minuten in Eosin. (Theorie und Technik der Autoradiographie: BASERGA 1967)

Auswertungsmodus

Für die Auszählung und Statistik wurden markierte Tumorschnitte verwendet, die autoradiographisch und histologisch befriedigen konnten. Bestimmt wurde der Markierungsindex, d.h. der Prozentsatz der markierten zur Gesamtzahl der Zellen. Für die in-vivo markierten Schnitte wurde bei 360 facher Vergrößerung unter einem Netzkular mit Unterteilung in 400 Felder gezählt; entlang einem gedachten Durchmesser wurde Blickfeld an Blickfeld gereiht und ausgewertet, wobei je nach Breite des Tumors 3 - 7000 Zellen pro Schnitt gezählt wurden.

Vergleichende Zählungen der gleichen Areale auch bei 800 facher Vergrößerung (Ölimmersion) bestätigten für den untersuchten Bereich einen gleichgroßen Markierungsindex, so daß auch die kleinere Vergrößerung (360 x) für unsere Bestimmung ausreichte. Die Silberkörner pro Zelle wurden nicht systematisch abgezählt, sondern grob geschätzt und dementsprechend die Zellen in 2 Gruppen unterteilt: Zellen von 5 - 20 Körner und Zellen mit mehr als 20 Körnern.

Der Markierungsindex (M.I.) der in-vivo markierten Tumoren setzte sich aus grundsätzlich 2 verschiedenen stark markierten Arealen zusammen:

aus den stroma- und gefäßnahen Tumoranteilen mit ihrem hohen M.I., und den Zellen der gefäßfernen Tumorareale entsprechend der Gruppe 2 der Seite 13.

Ein geringer Nulleffekt in allen Präparaten schien unvermeidlich; jedoch konnten an allen Schnitten markierte Zellen durch ihre größere Silberkorndichte über dem Kern vom Nulleffekt abgegrenzt werden.

Wie allgemein bekannt (RAJEWSKY 1965), markiert sich in-vitro an Tumorbröckeln nur ein schmaler Saum, dessen Breite vom O_2 -Druck während der Inkubation abhängt. Unter unseren methodischen Bedingungen betrug die Markierungsbreite im

Mittel 150μ , maximal bis zu 260 und minimal bis etwa 30μ . Dabei ist schwer zu unterscheiden, ob dabei technische Zufälligkeiten mitspielen oder vielleicht nicht-proliferierendes Tumorparenchym mitangeschnitten wurde. Für die Auswertung konnten nur die markierten Randzonen der Gewebspartikel verwendet werden. Abb. 2 skizziert die Verhältnisse bei einem unbestrahlten Carcinombröckel:

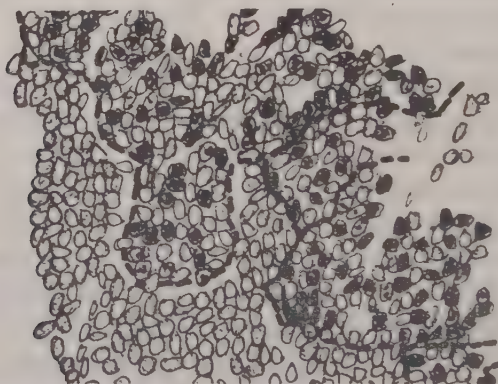


Abb. 2

Die etwa diagonal durch das Gewebe verlaufende, unterbrochene Linie trennt den markierten Zellsaum der Oberflächenbereiche (oben rechts) von den nicht-markierten Zellbereichen des Bröckelzentrums (unten links). Ausgezählt wurde nach in-vitro Markierung nur der markierte Saum.

Bei der vergleichenden Auszählung an den in-vitro markierten Tumoren wurde also das unmarkierte Zentrum bei allen Schnitten nicht beachtet.

Bei dem unregelmäßigen Verlauf der Markierungszone geht hier ein subjektiver Fehler ein - vor allem deswegen, weil

nicht-proliferierende Tumoreareale, die vom Zentrum her in den gut O_2 -versorgten Bereich hineinragten, ausgelassen wurden.

Wegen dieser Unsicherheiten benutzten wir ergänzend ein weiteres Auszählungsverfahren:

Sowohl nach in-vivo wie auch nach in-vitro Markierung wurden nur kleine, knospenartige Läppchen bis maximal 100μ verwendet, die sich bei in-vivo Markierung gleichmäßig markierten und bei in-vitro Markierung eindeutig in der gut durchmarkierten Randzone lagen. Je 7 - 12 solcher Tumorknospen mit 30 - 130 Zellen im Querschnitt wurden gezählt und der Markierungsindex bestimmt.

Mit dieser Form der Auswertung wurden also bewußt nur stark proliferierende Teile des Tumors und die Strahlenwirkung auf diese erfaßt.

Ergebnisse

Histologie und Proliferationsaktivität des Adeno-Mammacarcinoms bei in-vivo Markierung.

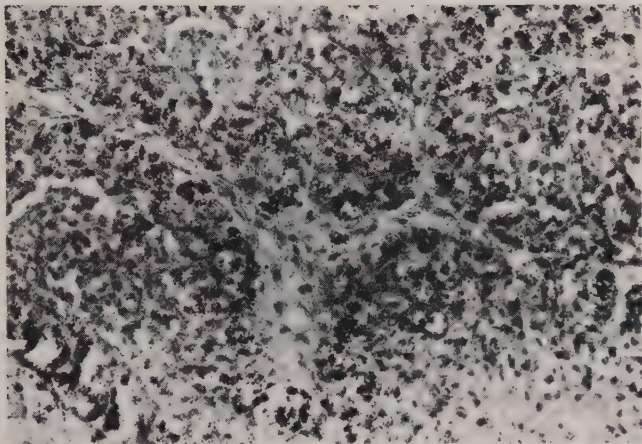
Ursprünglich bot der Tumor das Bild eines soliden Carcinoms mit regelmäßiger, azinös-lobulärer Struktur. Die Läppchen zeigten ebenfalls eine recht gleichmäßige Zellanordnung, wobei sich die Zellen der Randzone nach Größe, Form und Anfärbbarkeit von den zentraler gelegenen Zellen unterscheiden ließen; autoradiographisch war der Tumor dadurch ausgezeichnet, daß sich nur diese Randzone nach Art einer Keimschicht markierte. Wichtig ist dabei, daß nur die äußerste Zellage mit einer Breite von 20 - 30μ markiert war. Durch Tötung zu verschiedenen Zeitpunkten nach 3H -Thymidin-Zufuhr ließ sich der für diesen Tumor charakteristische Zellumsatz verfolgen. Die markierten, randständigen Zellen wanderten

zum Läppchenzentrum, daß sie nach etwa 8 Tagen erreichten und in dem sie - bei größeren Läppchen unter Bildung von nekrotischen Zonen - zugrunde gingen. Häufig wurden regelmäßig gebaute Drüsenschläuche beobachtet, die nur sehr selten markierte Zellen aufwiesen.

Zur Zeit ist der Tumor weitgehend entdifferenziert; nur gelegentlich bilden sich Läppchen mit schmaler, länglicher Form aus. Die drüsengangartigen Schläuche sind nur noch selten anzutreffen. Die Masse des Parenchyms ist von unregelmäßigen Bindegewebssepten durchzogen. Am Rande des Tumorknotens erfolgt neben infiltrierendem Wachstum oft eine Aussprossung mit "Knospen", in deren Durchschnitt 30 - 130 Zellen liegen. Abbildung 3 stellt solche Knospen am Tumorrand mit ihren Markierungen dar.

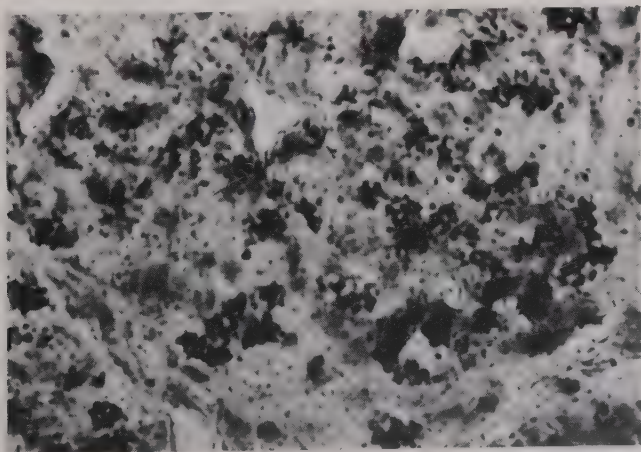
Die Gefäße sind zahlreich und kleinkalibrig; sie nehmen zum Tumorzentrum hin numerisch ab. Bei einem Tumordurchmesser von 5 mm und mehr, wie er meist am 10. - 14. Tag nach Implantation erreicht ist, treten in den größeren Parenchymarealen zentrale, spontane Nekrosen auf, die sich zur Tumormitte hin häufen.

Autoradiographisch markieren sich die stromanahen Zellagen wesentlich stärker als die zentralen Partien. Schon bei schwacher Vergrößerung beeindruckt ein schwarzer Markierungssaum, der die Stromasepten begleitet und eine mittlere Breite von 90 μ hat; jedoch streuen die Werte maximal von 30 bis 200 μ . (Foto 1a und 1b entsprechen diesem Sachverhalt; 1a aufgenommen bei 125 facher Vergrößerung, 1b als Ausschnittsvergrößerung von 1a.)



1a

Die Aufnahme wurde von einem unbestrahlten Mamma-Carcinom der C3H-Maus gemacht. Die markierten Zellen rings um die Stromasepten sind gut zu erkennen.



1b

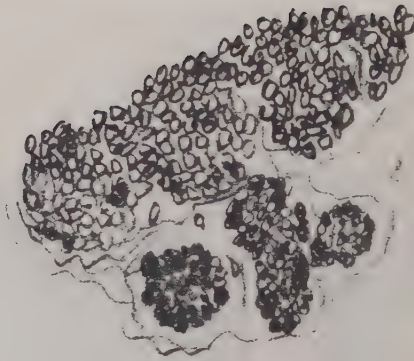


Abb. 3

Markierte "Knospen" am Tumorrand. Text S. 10.

In dem stark markierten Saum ist die Zahl der markierten Zellen, gemessen am Markierungsindex (etwa 30 %) und die Silberkornzahl pro Zelle sehr groß (100 - 200). Somit hat sich der Tumor im Laufe der Transplantationsgenerationen nicht nur histologisch, sondern auch autoradiographisch erheblich verändert. Gegenüber der früheren, ausschließlichen Markierung randständiger Läppchenzellen besteht jetzt in allen Tumorearealen eine proliferative Aktivität auch läppchenzentraler Areale, jedoch mit einem Gradienten entsprechend der O_2 -Versorgung. In den gefäßfernen Zonen ist die Zahl der markierten Zellen sowie deren Silberkornzahl ganz erheblich verringert. Es kann als bewiesen angesehen werden, daß die bevorzugte Markierung gefäßnaher Zonen vorwiegend auf die Sauerstoffverhältnisse im Tumor zurückzuführen ist. Nach O. Warburg (1930) sinkt in einem sauerstoffverbrauchenden Gewebe die O_2 -Spannung des arteriellen Blutes

in einem Abstand von 150 μ auf nahezu Null ab. Offenbar ist zur DNS-Synthese eine Mindest-Sauerstoffspannung nötig, die durch das Kapillarnetz eines Gewebes gewährleistet wird (WARBURG 1955; TANNOCK 1968).

Somit lassen sich an dem Adeno-Mamma-Carcinom der C3H-Maus 3 Zonen unterscheiden:

1. eine Zone starker Markierung und somit großer Proliferationsintensität in Stroma- und Gefäßnähe,
2. eine Zone vitaler, aber nicht oder nur schwach markierter (= proliferierender) Zellen,
3. eine nekrobiotische, gefäßferne Zone.

Diese Anordnung, die mutatis mutandis bei zahlreichen anderen Tumortypen gefunden wird, ist für das Verständnis der experimentellen und therapeutischen Tumorwirkung in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung:

Bekanntlich sind Zellen, die während der Bestrahlung gut mit Sauerstoff versorgt sind, um einen Faktor 2 - 3 strahlenempfindlicher als stark hypoxische oder anoxische Zellen (LITTBAND, REVESZ 1968; FOWLER, DENEKAMP, HEGAZY 1971; McNALLY 1972).

Die proliferative Aktivität hängt von der O_2 -Versorgung ab. Da aber proliferierende Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit strahlenempfindlicher sind als Zellen in Teilungsrue, ergibt sich ein 2. Grund für die unterschiedliche Ansprechbarkeit von Zellen des gleichen Tumors auf ionisierende Strahlen (HUG 1967). Bei einer fraktionierten Bestrahlung ist für den Effekt von entscheidender Bedeutung, daß nach Abtötung und Lyse der proliferierenden Zonen eine Re-oxygenierung erfolgen kann, welche aus doppelten Gründen die Strahlenempfindlichkeit der bisher ruhenden Zellen erhöht (THOMLINSON 1966; HOWES 1969; LITTBAND, REVESZ 1969).

Bei den meisten Tumoren ist ein großer Teil der Zellen hypoxisch. Der unterschiedlich hohe Prozentsatz anoxischer Zellen ist eine wesentliche Ursache für die unterschiedli-

che Strahlenempfindlichkeit verschiedener Tumortypen. Für ein Mamma-Carcinom der C3H-Maus haben FOWLER und DENEKAMP (1970) einen typischen, hypoxischen Anteil von 15 % bei 8 mm Knotendurchmesser gefunden.

Die bisherigen proliferationskinetischen Befunde an diesem Tumor fügen sich in das generelle Bild der Tumorzellkinetik ein, das in letzter Zeit mehr und mehr vervollständigt wird:

Solide Tumoren weisen nur am Anfang ihres Wachstums ein exponentielles Wachstum auf. Nur in dieser Zeit, in der alle Zellen an der Proliferation beteiligt sind, ist die Volumenverdoppelungszeit des Tumors identisch mit der Generationszeit der Tumorzellen. Mit zunehmender Größe und zunehmendem Alter erfolgt eine zunehmende Abweichung von diesem exponentiellen Wachstum, weil

- a) eine ständig abnehmende Fraktion der Zellen proliferiert - die sogenannte "growth fraction" wird kleiner;
- b) ein zunehmender Teil des Tumors nekrotisch wird - die Zellverlustrate steigt an.

Strahlenbedingte Veränderungen des Tumors

Die histologischen Veränderungen des Tumors entsprachen - besonders auch nach Strahleneinwirkung - den Befunden von SZCZEPANSKI, HUG, SPANGENBERG, die den gleichen Tumor untersucht hatten. Innerhalb von 12 Stunden nach Bestrahlung entwickelte sich das Bild des akuten, zellulären Strahlenschadens mit Zell- und Kernschwellung und Vakuolisierung, Kernpyknose und Karyorhexis. Auch wir konnten beobachten, daß diese Erscheinungen des akuten Zellverfalls bevorzugt in den stark markierten, stromanahen Arealen auftraten.

24 und 48 Stunden nach Bestrahlung war dieser Befund annähernd der gleiche; nach 96 Stunden fanden sich kaum mehr

Zeichen des akuten Zelluntergangs. Zell- und Kernschutt waren abgeräumt; das erhaltene Parenchym bot ein normales Bild. Die relative Zunahme des Bindegewebes war besonders nach 1200 R ausgeprägt.

Die Kurven der Abbildungen 4 und 5 geben den zeitlichen Verlauf des Markierungsindex bei in-vitro und in-vivo Markierung nach Dosen von 600 und 1200 R wieder. Diese Kurven spiegeln die Verhältnisse bei unselektierter Auszählung wieder, wie es weiter oben beschrieben wurde. Abbildung 6 zeigt die Befunde bei ausschließlicher Auszählung der stark proliferierenden Knospen.

Alle Kurven weisen trotz Abweichungen im einzelnen annähernd den gleichen Verlauf auf. Der M.I. fällt innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung steil ab, erreicht ein Minimum nach 6 bis 12 Stunden, und nähert sich im Verlaufe der nächsten Tage einem Endwert, der bei der niedrigeren Dosis dem Ausgangswert in etwa entspricht, bei der höheren Dosis darunter liegt.

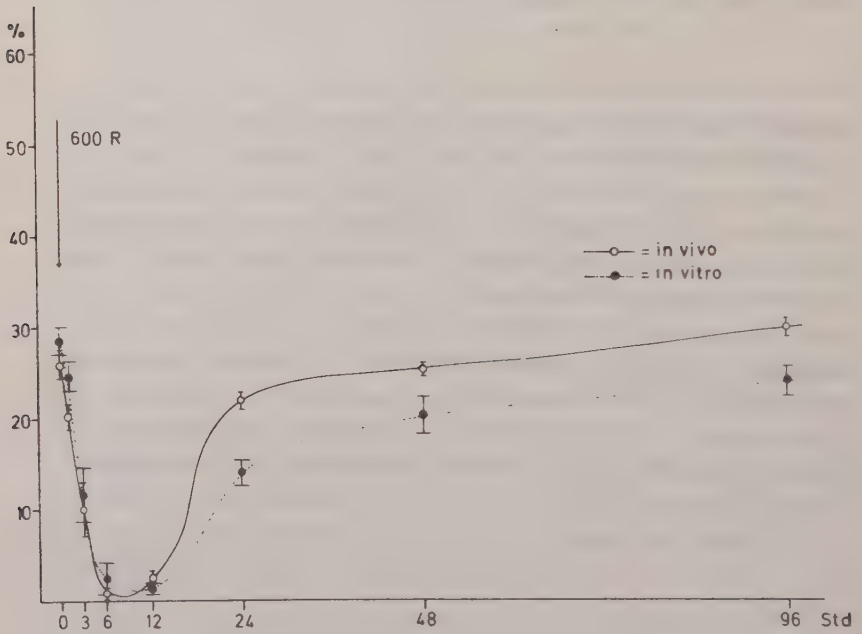


Abbildung 4

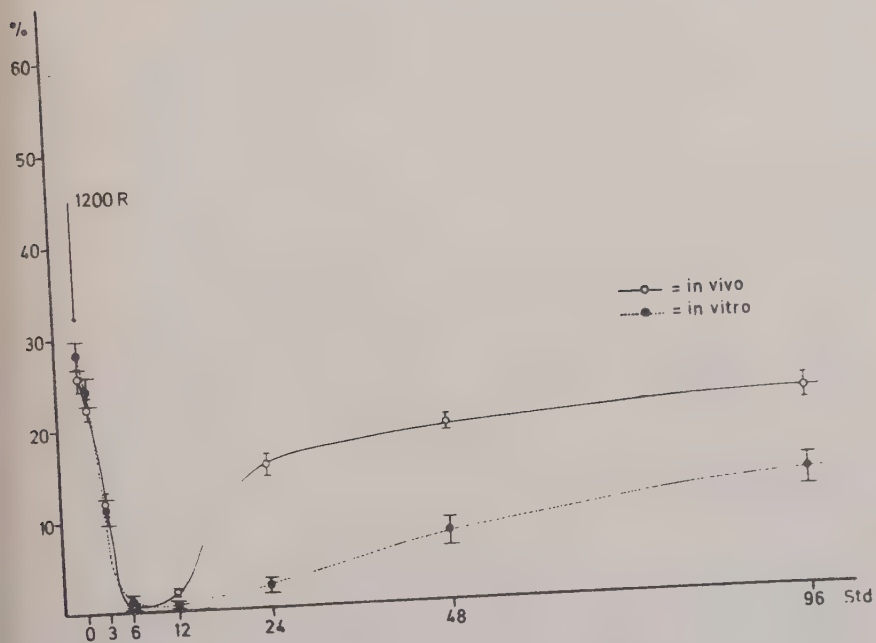


Abbildung 5

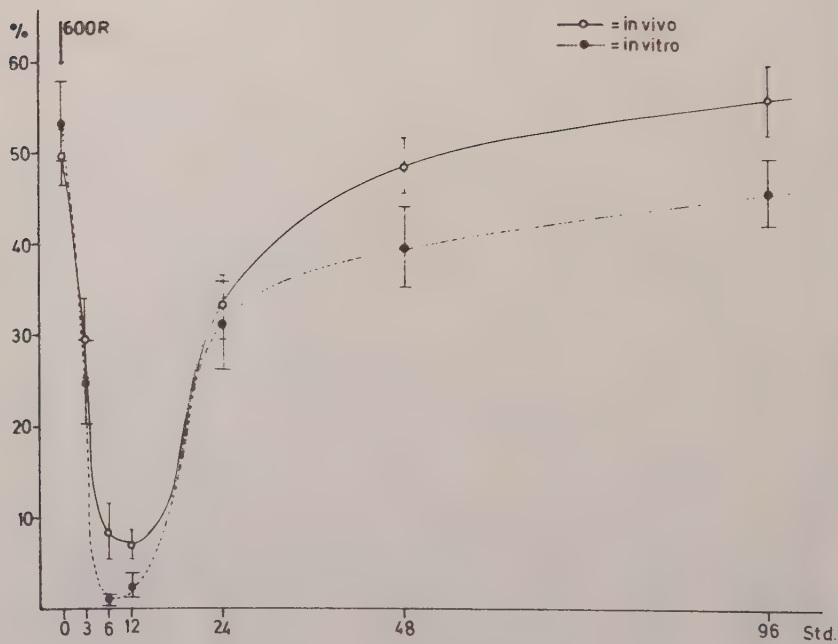


Abbildung 6

Nach 600 R fällt der Ausgangswert der in-vivo Markierung von 26 % auf ein Minimum von 1,2 % zum 6-Stundenintervall ab, steigt aber nach 24 Stunden schon wieder steil auf 22 % an und erreicht unter Abflachung der Erholungskurve sogar mehr als im unbestrahlten Zustand: mit 31,5 % scheint der Strahleninsult voll kompensiert.

Bei der in-vitro Markierung verläuft der Index bis zum Minimum fast übereinstimmend, bleibt aber im weiteren Verlauf der Kurve 4 - 6 % unter den entsprechenden Werten der in-vivo Kurve.

Nach 1200 R ist der initiale Abfall noch etwas steiler, der Wiederanstieg jedoch deutlich verzögert und der Endwert nach 96 Stunden erst eindeutig unter dem Ausgangswert. Noch ausgeprägter ist hier die wesentlich geringere Erholung des M.I. nach in-vitro Markierung.

Bei selektiver Auswertung der stark proliferierenden "Knospen" ist naturgemäß der Ausgangswert des Markierungsindex höher: er liegt für beide Markierungsmethoden um 50 %, fällt nach 600 R in wenigen Stunden auf Werte unter 10 % und erholt sich zunächst schnell, vom 3. Tag ab verlangsamt. Das Überschießen des in-vivo Markierungsindex ist bei dieser Auszahlart 96 Stunden nach 600 R noch ausgeprägter als bei der weiter oben ausgeführten Zählart.

Im Vergleich der 600-R-Dosis mit der 1200-R-Dosis fiel uns noch auf, daß 3 - 5 Tage nach der größeren Dosis und nach Exzision die Tumoren an der Oberfläche zystische Auftreibungen vorwiesen; die Tumorumfänge hatten nach 1200 R mehr als die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes eingebüßt. Erst eine volle Woche nach 1200 R war das Ausgangsvolumen wieder erreicht. Im Gegensatz dazu sahen wir nach 600 R keine derartigen Cysten. Auch war der Tumor nicht so eingeschmolzen, sondern stagnierte nur 2 - 3 Tage bei gleichem Volumen.

(DENEKAMP, THOMLINSON 1971)

Diskussion

Zahlreiche, vergleichende Studien anderer Autoren hatten gezeigt, daß eine in-vitro Markierung normaler und maligner Gewebe, gemessen am Markierungsindex, annähernd das gleiche proliferative Verhalten wiedergibt wie eine in-vivo Markierung. So hatten schon 1966 RAJEWSKY sowie HELPAP, MAURER (1967b), FABRIKANT, WISSEMAN (1968) und FABRIKANT, WISSEMAN, VITAK (1969) in ihren Arbeiten auf die gute Übereinstimmung der beiden Markierungsmethoden bei Tiertumoren hingewiesen. Überdies gibt es einige Arbeiten über Markierungen - auch vergleichende - an menschlichen Tumoren. So hatten RUBINI et al. (1961), JOHNSON et al. (1960), OEHLERT, LESCH (1965), TITUS, SHORTER (1965), HELPAP, MAURER (1969) gleich gute Ergebnisse nach in-vitro/in-vivo Simultanmarkierung. Neuerdings hat J. DENEKAMP (1970) allerdings darauf verwiesen, daß sie bei 12 verschiedenen Tumortypen nur bei 60 % dieser Typen vergleichbare Ergebnisse erzielt hatte.

Unseres Wissens aber wurde bisher noch nicht versucht, den zeitlichen Verlauf des Markierungsindex nach einer Störung der Proliferation, wie durch Einwirken ionisierender Strahlen, mit beiden Methoden zugleich zu verfolgen. Unsere Befunde am Mamma-CA bestätigen, daß der Markierungsindex des unbestrahlten Tumors bei beiden Markierungsmethoden annähernd die gleichen Werte hat und daß ferner die in-vitro Markierung den zeitlichen Verlauf des Markierungsindex nach Bestrahlung in befriedigender Übereinstimmung mit den wahren in-vivo Verhältnissen wiedergibt. Eine quantitative Abweichung der in-vitro Markierung in der Erholungsphase nach Bestrahlung ist dabei auffällig - besonders nach 1200-R. Hier bleibt der in-vitro Index erheblich unter dem in-vivo-Index. Gerade zum 24- und 48-Stundenzeitpunkt wird diese Differenz deutlich. Dieses Phänomen ist noch nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um den Ausdruck eines Strah-

lenschadens auf die DNS-Synthese, der unter den künstlichen (in-vitro) Bedingungen stärker zum Ausdruck kommt. Es ist aber auch daran zu denken, daß durch die starke Strahleneinwirkung die Diffusionsverhältnisse bei in-vitro Markierung gestört sein können.

Ungeachtet dieser noch zu klärenden Frage hat die mir gestellte Frage zu einem befriedigenden Resultat geführt:

Wie im Rahmen des Arbeitsprogrammes unseres Institutes beabsichtigt, kann die in-vitro Markierung auch bei menschlichen Tumoren eingesetzt werden, wenn es darum geht, die Proliferationskinetik unter Einwirkung eines therapeutischen Agens wie ionisierenden Strahlen oder auch von Zytostatika in qualitativer Weise zu verfolgen. Darüberhinaus erbrachten die Versuche folgende Befunde, die als Ergänzung zu bisherigen tier-experimentellen Untersuchungen über die Wachstumscharakteristik und über die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren zu betrachten sind:

Die schon von v. SZCZEPANSKI, HUG (persönliche Mitteilung) beobachtete Änderung des räumlichen Proliferationsmusters des Adeno-Carcinoms während einer langen Transplantationskette wurde bestätigt und ergänzt. Der ursprünglich hohe Differenzierungsgrad des Tumors dokumentierte sich damals auch darin, daß die Proliferation ausschließlich in einer "Keimzone" am Rande der Tumorläppchen stattfand. Nach ca. hundert Transplantationen ist das gesamte, vitale Tumorparenchym proliferationsfähig und die Unterschiede der gut versorgten, gefäßnahen sowie gefäßfernen Zonen sind nur noch gradueller Art.

Hinsichtlich der Wirkung einmaliger Dosen von 600 und 1200 R ergaben sich folgende Beobachtungen, die weiterer Überprüfung bedürfen:

Dosen dieser Größe sind ausreichend, um den Markierungsindex eines Tumors innerhalb von 6 Stunden auf ein Minimum von wenigen Prozent zu reduzieren. Nach 12 Stunden aber

setzt eine Erholung mit initialer, großer Steilheit und nachfolgender Abflachung ein. Die Wirkung der höheren Dosis macht sich vorwiegend in einer Verzögerung dieses Wiederanstieges bemerkbar.

Bei der Bewertung unserer Befunde ist jedoch zu beachten, daß die angewandte Methode nur eine bedingte Aussage über die Reaktion auf ionisierende Strahlen erlaubt. Der Markierungsindex gibt nur die proliferative Aktivität der überlebenden bzw. noch histologisch intakten Tumorzellen an. Eine Aussage über den Grad der Zellabtötung und -inaktivierung kann damit nicht gewonnen werden. Die Bestimmung des M.I. muß also ergänzt werden durch Methoden, aus denen Schlüsse auf die absolute Zahl vitaler Zellen und deren Proliferationsrate gezogen werden können. Dies wurde am gleichen Tiertumor in unserem Institut versucht. Nach ^3H -Thymidin-Applikation wurde die spezifische und die Gesamt-Aktivität des Tumors in Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung verfolgt. Hierbei ergab sich eine wesentlich ausgeprägtere Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der Dosis. Nach unseren Untersuchungen erreicht die proliferative Aktivität der überlebenden Zellen schon nach 24 Stunden fast den alten Wert. Die spezifische Aktivität des Tumorgewebes und das Tumorgewebe nimmt aber bei 600 R nach 2 Tagen und bei 1200 R nach 5 Tagen wieder zu.

Es ist Aufgabe weiterer experimenteller und klinischer Forschung, unter Einsatz der beschriebenen Markierungsmethoden weitere Aufschlüsse über das spezifische Wachstumsverhalten verschiedener Tumortypen und deren Strahlenempfindlichkeit zu gewinnen.

Zusammenfassung

Im Rahmen eines Arbeitsprogrammes, das der strahlenbiologischen Unterbauung der radiologischen Tumorthherapie gewidmet ist, wurde mittels ^3H -Thymidin-Markierung die Wirkung einer Roentgenbestrahlung auf das Adeno-Mamma-Carcinom der C3H-Maus untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob sich die strahleninduzierte Proliferationsstörung auch durch in-vitro Markierung des Tumorgewebes nachweist und in ihrem zeitlichen Verlauf verfolgen läßt. In-vivo und in-vitro Markierungen erbrachten annähernd den gleichen Markierungsindex vor Bestrahlung und zeigten in weitgehender Übereinstimmung den gleichen Abfall und Wiederanstieg der proliferativen Aktivität. Gewisse Abweichungen, vor allem in der Erholungsphase, wurden beobachtet. Die Ergebnisse lassen es aussichtsreich erscheinen, die Strahlenreaktion menschlicher Tumoren durch in-vitro Markierung zu verfolgen.

Literaturhinweise

- BASERGA, R.: in "Methods in Cancer Research" by H. Busch;
Vol. 1, 48 - 107 Acad. Press, New York, London
1967
- BERRY, R.: Zelluläre Faktoren der Strahlenempfindlichkeit,
1 - 10, in O. Hug: Präoperative Tumorbestrahlung,
Urban-Schwarzenberg München-Berlin-Wien
1971
- DENEKAMP, J.: Tumor Kinetics after Irradiation 52 - 55;
Cancer Research Campaign, Ann. Rep., Mount
Vernon Hospital, Middlesex 1970
- DENEKAMP, J.: The Cellular Proliferation Kinetics of Animal
Tumors 393 - 400, Cancer Res. 30
1970
- DENEKAMP, J., R.H. Thomlinson: The Cell Proliferation Kinetics
of Four Experimental Tumors after Acute
X-irradiation 1279 - 1284, Cancer Res. 31
1971
- FABRIKANT, J.I., C.L. WISSEMAN: Tritiated Thymidine in Normal
and Neoplastic Tissues 361 - 363, Radiology
Vol. 90 1968
- FABRIKANT, J.I., WISSEMAN, C.L., M.J. Vitak:
The Kinetics of Cellular Proliferation in Normal
and Malignant Tissues 1309 - 1320, Rad. Res. 92
1969
- FEINENDEGEN, L.E.: Autoradiographische und biochemische Untersuchungen
der Zellproliferation in-vivo
12 - 21 in O. Hug: Präoperative Tumorbestrahlung;
Urban & Schwarzenberg München-Berlin-Wien
1971

- FOWLER, D., J. DENEKAMP: Folgerungen aus tierexperimentellen Studien über die Zellkinetik in Tumoren und der Haut 22 - 35 in O. Hug: Präoperative Tumorbestrahlung; Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1971
- FOWLER, D., J. DENEKAMP: Cancer Res. Campaign 59, Mount Vernon Hospital, Middlesex; Ann. Rep. 1970
- HELPAP, B., W. MAURER: ^3H -Thymidin-Einbau unter in-vivo und in-vitro Bedingungen an Geweben von Maus und Ratte 520 - 534; Naturwiss. 54 1967b
- HELPAP, B., W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen zur Frage der Vergleichbarkeit des Einbaues von markiertem Thymidin unter in-vivo Bedingungen und bei Inkubation von Gewebeproben 102 - 118; Virchows Archiv Abt. B 4 1969
- HOWES, A.E.: An estimation of changes in the proportions and absolute Numbers of hypoxic cells after irradiation of transplanted ^3H -mouse mammary tumours; 441 - 447 Brit. J. Rad. 42 1969
- HUG, O.: persönliche Mitteilungen 1971, 1972
- HUG, O.: Zytologische Aspekte der Strahlentherapie, 147 - 159 Radiol. Austr. XV/2 1964
- HUG, O.: Strahlenbiologische Beiträge zur Therapie maligner Geschwülste 324 - 337, Z. schr. Laryn. Rhin. Ot. 5 1967

HUG, O., L. von SZCZEPANSKI:

Cell Proliferation and Radiosensitivity in
Transplantable Animal Tumors 85 - 93; IAEA-SM-
118/31 Vienna 1969

JOHNSON, H.A., J.R. RUBINI, E.P. CRONKITE, V.P. BOND:

Labeling of Human Tumor Cells in vivo by Tritiated
Thymidine 460 - 465; Lab. Inv. 9 1960

LAMERTON, L.F.: The Response of Mammalian Cell Populations
to continuous irradiation 643 - 658; Radiation
Research 1966 / North Holland Publ. Co. Amsterdam

1967

LITTBAND, B., L. REVESZ:

Survival of cells in Anoxia 479 - 480; Brit. J.
Rad. 41 1968

LITTBAND, B., L. REVESZ: The effect of oxygen on cellular
survival and recovers after irradiation;

914 - 924, Brit. J. Rad. 42 1969

McNALLY, N.J.: Recovery from sub-lethal damage by hypoxic
tumour cells in vivo 116 - 120; Brit. J. Rad. 45

1972

MENDELSON, M.L.: The Kinetics of Tumor Cell Proliferation
498 - 513; Cell. Rad. Biol., Williams & Wilkins
Co., Baltimore 1965

MENDELSON, M.L.: Radiation Effects in Tumors 659 - 675;
Rad. Res. 1966 / North Holland Publ. Co., Am-
sterdam 1967

OEHLERT, W., L. LESCH: Autoradiographische Untersuchungen
des RNS- und DNS-Stoffwechsels in menschlichen
Tumoren 295 - 298; Europ. J. Canc. Vol. 1

1965

PILGRIM, Ch., MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchungen über die Konstanz der DNS-Verdoppelungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin 183 - 199; Exptl. Cell Res. 37 1965

RAJEWSKY, M.: Thymidin-Inkorporation und O_2 -Konzentration in Explantaten normaler und maligner Gewebe in-vitro 341 - 342 1965

RAJEWSKY, M.: Zellproliferation in normalen und malignen Geweben - ^3H -Thymidineinbau in-vitro unter Standardbedingungen 65 - 75; Biophys. 3 1966

RUBINI, R.J., CRONKITE, E.P., V.P. BOND, S. KELLER:
In-vitro Labeling of Proliferating Tissues and Tumors with Tritiated Thymidine 223 - 230; J. Nucl. Med. 2 1961

SINCLAIR, W.K.: Radiation Effects on Mammalian Cell Populations in-vitro 607 - 630, North Holland Publ. Co., Amsterdam 1967

von SZCZEPANSKI, L.: persönliche Mitteilungen 1972

von SZCZEPANSKI, L., O. HUG, G. SPANGENBERG:
Fraktionierungsstudien an transplantablen Tiertumoren unter zellkinetischen Aspekten, in O. Hug: Präoperative Tumorbestrahlung 36 - 48, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1971

TANNOCK, I.F.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplantable Mouse Mammary Tumor 258 - 273; Brit. J. Canc. 22 1968

THOMLINSON, R.H.: Book Abstr. III. Int. Con. Rad. Res.
221 - 226 1966

THOMLINSON, R.H.: Changes in oxygenation in tumours in relation to irradiation 109 - 120; in: Frontiers of Radiation Therapy and Oncology, Vol. 3, Karger, Basel 1968

THOMLINSON, R.H., L.H. GRAY:
The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy 539 - 549; Brit. J. Canc. 9 1955

TITUS, J.L., R.G. SHORTER:
Labeling of Human Tumors with Tritiated Thymidine 324 - 328; Arch. Path. Vol. 79 1965

TUBIANA, M.: The kinetics of tumor cell proliferation and radiotherapy 325 - 347; Brit. J. Rad. 44 1971

TUBIANA, M., E. FRINDEL, E. MALAISE:
The application of radiobiologic knowledge and cellular kinetics to radiation therapy 822 - 829; Am. J. Roentg. 102 1968a

WARBURG, O.: Naturwiss. 42 : 401 - 410 1955

WARBURG, O.: The Metabolism of Tumors. English Ed.
(Dickens) Constable Co. Ltd., London 1930

Lebenslauf

Am 18. November 1946 wurde ich als zweiter Sohn des Ehepaares Dr. med. Theo Kleinschmidt und Frau Edith, geb. Teske, in Holzminden an der Weser geboren. Nach dem Umzug nach Bad Pyrmont besuchte ich ab Ostern 1953 dort die Volksschule, ab Ostern 1957 das neusprachliche Gymnasium. In der Oberstufe nahm ich als Austauschschüler am "senior year" mit anschließendem amerikanischen Abitur der Proviso West High School in Chicago teil. Nach meiner Rückkehr bestand ich im Februar mein Abitur in Bad Pyrmont und erhielt zum Sommersemester 1966 meine Medizinzulassung an der Münchener Universität. Während meines 11-semesterigen Studiums konnte ich bei mehreren Reisen Großkliniken in den USA, Mexiko, Thailand und Japan besuchen.

Im Dezember 1971 legte ich in München das Staatsexamen ab und befinde mich seit 1.1.1972 in der Medizinal-Assistenz-Zeit; nach der Approbation strebe ich die Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin an.

Heide Wenz

